

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Februar 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/09612 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07348

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Juli 2000 (29.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
09/368,314 3. August 1999 (03.08.1999) US

(71) Anmelder: ARZNEIMITTELWERK DRESDEN
GMBH [DE/DE]; Meissner Str. 35, D-01445 Radebeul
(DE).

(72) Erfinder: RUNDFELDT, Chris; Melanchtonstr. 11,
D-01640 Coswig (DE). NETZER, Rainer; Dülsterntweete
47, D-22549 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BG, BR, BY, CA,
CN, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ,
LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR,
UA, UZ, YU, ZA.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): eurasisches Patent (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/09612 A1

(54) Title: MODULATING BINDING SITE ON POTASSIUM CHANNELS USED FOR SCREENING

(54) Bezeichnung: MODULATORISCHE BINDUNGSSTELLE AN KALIUMKANÄLEN ZUM SCREENING

(57) Abstract: The invention relates to a novel selective modulating binding site on the potassium channel with the subunits KCNQ2 and KCNQ3 that are characterized by retigabine. This novel binding site can be used to screen and find novel substances for treating diseases that are related to a hyperexcitability or a hypoexcitability of the neuronal cells.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine neue selektive modulatorische Bindungsstelle des Kaliumkanals mit den Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3, die durch Retigabin gekennzeichnet, zum Screening und Auffinden von neuen Wirkstoffen zur Behandlung von Erkrankungen, die auf eine Übererregung oder mangelnde Erregbarkeit von neuronalen Zellen zurückzuführen sind.

Modulatorische Bindungsstelle an Kaliumkanälen zum Screening

Die Erfindung betrifft eine neue selektive modulatorische Bindungsstelle an Kaliumkanälen zum Screening und Auffinden von neuen Wirkstoffen zur Behandlung von Erkrankungen, die auf eine Übererregung oder mangelnde Erregbarkeit von neuronalen Zellen zurückzuführen sind.

Kaliumkanäle haben ausgesprochen vielfältige Funktionen in elektrisch erregbaren und nicht erregbaren Zellen. Zu diesen Funktionen gehört unter anderem die Kontrolle des Membranpotentials, die Regulation der Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen, die Steuerung der Freisetzung von Zytokinen aus T-Lymphozyten, die Regulation des Salz- und Wasserhaushalts in Nierenzellen und die Steuerung der elektrischen Erregbarkeit und synaptischen Plastizität in Neuronen.

Es ist deshalb nicht überraschend, daß die Aktivität von Kaliumkanälen einer Vielzahl von Steuerungsmechanismen unterliegt, wozu das Redoxpotential einer Zelle, die sekundären Botenstoffe Kalzium und cyclo-Adenosinmonophosphat (c-AMP), Proteinkinasen und -phosphatasen, und das Membranpotential gehören.

Zudem weisen die Strukturen der bisher charakterisierten Kaliumkanalproteine vielfältige Varianten von verschiedenen Grundmotiven auf und sind damit sehr heterogen. Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen ist es auch nicht verwunderlich, daß verschiedene Kaliumkanäle ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich vorkommen (1).

Durch diese vielfältigen Strukturen in Verbindung mit der sehr großen Bandbreite der Modulationswege werden Kaliumkanäle selektiv ihren heterogenen Aufgaben gerecht. Substanzen, die Kaliumkanäle selektiv modulieren, sind interessante Medikamente für eine Vielzahl von unterschiedlichen Erkrankungen. In der Literatur werden Kaliumkanäle als Targets für die Behandlung des Schlaganfalls, der Epilepsie, der

Alzheimer'schen Erkrankung, bei psychiatrischen Erkrankungen, bei Störungen des Schlafs, bei Rhythmusstörungen des Herzens, bei Diabetes Typ II, bei osmotischen Dysfunktionen wie bei Glaukom, bei Tumorzellwachstum, aber auch bei Entzündungsprozessen und bei Lernleistungsstörungen, bei Bluthochdruck, Blasenschwäche und Asthma diskutiert.

Bisher konnte die Diabetesbehandlung und die Behandlung von Rhythmusstörungen des Herzens und Bluthochdruck mit selektiven Medikamenten mit Erfolg implementiert werden (1).

1998 berichteten Schröder et al. zum erstenmal, daß eine mutationsbedingte geringfügige Beeinflussung nur eines Mitglieds der großen Familie der Kaliumkanäle das fragile Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung bei erregbaren Zellen substantiell stören kann. Bei diesem bestimmten Kanal handelt es sich um ein Heterooligomer aus den Untereinheiten mit der Bezeichnung KCNQ2 und KCNQ3. Durch Mutation von einer der beiden Untereinheiten wird die Funktion dieses Kanals um ca. 25% reduziert. Dies führt bei den betroffenen Patienten dazu, daß sie bereits im Säuglingsalter an epileptischen Anfällen leiden (2).

Dieser Kanal ist der erste Kaliumkanal, der eindeutig einer Erkrankung des Menschen zugeordnet werden konnte.

Schröder postulierte, daß eine positive Modulation dieses Kanals eine starke antikonvulsive Wirkung hervorrufen sollte. Er schlußfolgerte, daß durch Steigerung des Spiegels des intrazellulären Botenstoffes cAMP die Aktivität des Kanals positiv beeinflusst wird; er konnte in seinen in vitro Systemen zeigen, daß bei gesteigerten cAMP-Spiegel tatsächlich die Aktivität des Kanals zunahm.

Etwa zur gleichen Zeit zeigten Wang et al. (3), daß der oben erwähnte beim Menschen nachgewiesene heterooligomere Kanal bestehend aus KCNQ2 und KCNQ3 das molekulare Korrelat des funktionell seit langem beschriebenen M-Kanals ist.

Der M-Kanal wird selektiv nur in neuronalen Zellen ausgebildet (2, 3) und ist dort über intrazelluläre Signalproteine (G-Proteine) selektiv im Zentralnervensystem an muskarinerge Subtypen des Acetylcholinrezeptors gekoppelt. In peripherem Gewebe wird der Kanal nicht exprimiert. Während Muskarinagonisten die Aktivität des Kanals senken, kann diese durch Muskarinantagonisten gesteigert werden.

Der Muskarinagonist Pilocarpin löst beim Tier schwere Krämpfe aus. Der daraus resultierende Untergang der Zellen, in denen der Muskarinrezeptor (und damit auch den M-Kanal) exprimiert ist führt dazu, daß die Tiere nach dieser Behandlung spontane Epilepsien entwickeln.

Durch einen anderen Muskarinagonisten, Oxotremorin, läßt sich beim Tier in subletalen Dosen ein essentieller Tremor auslösen, der dem Tremor des Parkinsonpatienten ähnelt. Muskarinantagonistische Substanzen werden zur Behandlung dieses Tremors klinisch eingesetzt.

Aus diesen exemplarischen Darstellungen wird deutlich, daß eine indirekte (über Muskarinrezeptoren ausgelöste oder durch Steigerung der cAMP-Spiegels hervorgerufene) Modulation des M-Kanals eine hoch interessante Möglichkeit darstellt, in verschiedene Erkrankungen einzugreifen.

Im Einzelnen soll dies ausführlicher für mehrere Erkrankungen dargestellt werden.

Epilepsie

Die Erkrankung Epilepsie ist durch das wiederholte Auftreten von Krampfanfällen charakterisiert. Sie tritt in der Bevölkerung mit einer Prävalenz von 0.5-1% auf. Die epileptischen Krampfanfälle resultieren aus einer abnormen Synchronisation und massiven Entladung einer großen Anzahl von Nervenzellen in einem Nervenzellverband im Gehirn. Je nach Beteiligung verschiedener Gebiete des Gehirns resultiert dies in einer anfallsartigen vorübergehenden Störung der Bewegung (motorische Krämpfe), der Empfindung, des Verhaltens oder der Wahrnehmungsfähigkeit (4).

Der Krampfanfall ist jedoch nur ein Symptom, das prinzipiell bei jedem Individuum ausgelöst werden kann, wenn der Stimulus zur Aktivierung und Synchronisation ausreichend stark ist. Die Erkrankung Epilepsie ist daher durch die erhöhte Empfindlichkeit auf äußere oder innere Reize zur Synchronisation und Aktivierung charakterisiert. Die Erregbarkeit und damit die Empfindlichkeit von Nervenzellen ist bei epileptischen Patienten größer als bei nicht epileptischen Patienten.

Kürzlich konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, daß Kaliumkanäle, die aus den Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 zusammengesetzt sind, entscheidend die Erregbarkeit von Nervenzellen steuern (2).

Bereits eine Reduktion der Funktion dieser Kanäle um etwa 25% führt bei Säuglingen, die nicht über ausreichende kompensatorische Mechanismen verfügen, zu Epilepsie. Eine solche schwache Reduktion der Funktion dieses Kaliumkanals wurde für eine genetisch aufgeklärte Form der Epilepsie, die BFNC (benign familial neonatal convulsions, benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe), nachgewiesen (2).

Dieser Kaliumkanal ist nur im Gehirn und in Nervenzellen nachweisbar, nicht aber in anderen Geweben (2, 3).

Bei anderen Formen der Epilepsie konnte die genetische Ursache noch nicht aufgeklärt werden, jedoch geht die Erkrankung immer mit einer erhöhten Erregbarkeit von Nervenzellverbänden einher. Die bisher übliche Therapie setzt symptomatisch an. Eingeführte Antiepileptika wie Carbamazepin, Phenytoin und Lamotrigin wirken als nutzungsabhängige Blocker von Natriumkanälen. Diese Kanäle sind notwendig um zelluläre Erregungen entlang der Nervenfasern weiterzuleiten.

Natriumkanalblocker reduzieren die Weiterleitung von Erregungen und wirken auf diese Art antikonvulsiv. Die zugrundeliegende Übererregung wird nicht reduziert. Andere Antiepileptika wie Phenobarbital, Clonazepam, Vigabatrin, Topiramate oder Valproat verstärken die hemmende Nervenübertragung oder reduzieren die erregende Nervenübertragung, d.h. verringern die Wahrscheinlichkeit, daß eine Erregung auf andere Nervenzellen übertragen

wird. Auch hier wird die Ursache der Erkrankung, die zugrundeliegende Übererregbarkeit einzelner Nervenzellen, nicht beeinflusst sondern nur die Signalweiterleitung reduziert. Medikamente, die jedoch selektiv den oben erwähnten Kaliumkanal positiv modulieren, können direkt die Erregbarkeit von Nervenzellen beeinflussen. Da der Kanal nur in neuronalem Gewebe nachweisbar ist, ist eine selektive Wirkung ohne Nebenwirkungen auf andere Gewebe für solche Substanzen zu erwarten.

Morbus Alzheimer

Wie erwähnt stellt der Kaliumkanal bestehend aus den Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 das molekulare Korrelat des M-Kanals dar (3).

Der M-Kanal ist über eine enge Kopplung an einen Subtyp des Acetylcholinrezeptors, den Muskarinrezeptor des zentralen Nervensystems negativ gekoppelt. Muskarinrezeptoren außerhalb des Nervensystems sind nicht mit dem M-Kanal gekoppelt. Eine Aktivierung von Muskarinrezeptoren führt zu einer Reduzierung der Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kanals, also zu einer Reduktion der Funktion.

Dies wird bereits pharmakologisch ausgenutzt. Durch schwache Hemmung des Acetylcholin-abbauenden Enzyms Acetylcholinesterase mittels Medikamenten wie Donepezil-HCl (Aricept®) (Ich würde homogen bleiben und hier den Wirkstoff eintragen und nicht den Medikamentennamen) wird die Acetylcholinkonzentration im Gehirn erhöht, der Muskarinrezeptor aktiviert und dadurch der Kaliumkanal negativ moduliert (gehemmt).

Dies hat eine Erhöhung der Erregbarkeit von cholinergen Nervenzellen zur Folge. Beim Morbus Alzheimer gehen selektiv cholinerge Nervenzellen zu Grunde, was zu den bekannten Symptomen des Gedächtnisverlusts (Demenz) führt. Durch Erhöhung der Erregbarkeit der verbleibenden cholinergen Nervenzellen können diese die Funktion der untergegangenen Nervenzellen ausgleichen, wodurch dem Gedächtnisverlust entgegengewirkt wird.

Jedoch haben die Enzymhemmer der Cholinesterase entscheidende Nachteile. Da cholinerge Signalübertragung im ganzen Körper eine wichtige

Rolle spielt, so auch im Skelettmuskel und in anderen Geweben, und da die Substanzen die Cholinesterase überall hemmen, kommt es zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen wie Schwindel, Dyspepsie, Bauchschmerzen, Übelkeit und/oder Erbrechen, Diarrhö, Anorexie, Myalgie. Gelegentlich treten auch Schwäche, Ataxie, Schlaflosigkeit, Gewichtsabnahme und Bradykardie auf.

Um diese Nachteile zu umgehen, befindet sich die Substanz Linopirdine in der Entwicklung, welches nicht das cholinerge System beeinflusst, sondern den M-Kanal (= KCNQ2 + KCNQ3) blockiert (3).

Jedoch hat dieses Medikament den Nachteil, daß es keine ausreichende Selektivität gegenüber dem M-Kanal aufweist.

Es werden mit ähnlicher Affinität Kanäle blockiert, die in der Funktion des Herzmuskels eine große Rolle spielen, insbesondere der Kanal KCNQ1, aber auch die Kanäle eag1, erg1, erg3, elk1, Kv1.2 und Kv4.3, die im Herzen und in anderen Geweben weit verbreitet sind (3).

Das Ziel der selektiven Hemmung von KCNQ2/3 konnte daher mit Medikamenten, die die Linopirdin-Bindungsstelle modulieren, nicht erreicht werden.

Auch der neue Ligand für die Linopridin-Bindungsstelle, XE991, hemmt mit ähnlicher Affinität die Kanäle KCNQ1 und Kv4.3, die beide für die Herzfunktion von Bedeutung sind. Eine Blockade dieser herzspezifischen Kanäle kann fatale Rhythmusstörungen auslösen, so daß eine Weiterentwicklung dieser Substanzen fraglich ist.

Morbus Parkinson

Auch bei anderen Erkrankungen wird eine Modulation von zentralen Muskarinrezeptoren zur Behandlung angestrebt.

So werden Muskarinrezeptorantagonisten z.B. beim Morbus Parkinson zur Behandlung der Krankheitssymptome, vor allem des Tremors eingesetzt.

Wie beim Morbus Alzheimer ist jedoch auch hier die Selektivität von Muskarinrezeptorliganden für zentrale Rezeptoren nicht ausreichend und es

kommt durch Interaktionen mit peripheren Muskarinrezeptoren und anderen Ionenkanälen und Rezeptoren zu unerwünschten Nebenwirkungen. Da zentrale Muskarinrezeptoren mit dem M-Kanal gekoppelt sind, können M-Kanal Aktivatoren selektiver als Muskarinantagonisten diese Funktion ausüben. Diese Medikamente wurden bisher jedoch noch nicht beschrieben.

Neurodegenerative Erkrankungen

Neben den oben genannten Erkrankungen spielt Beeinflussung der Erregbarkeit von Nervenzellen aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle (5).

Nervenzelldegeneration tritt immer dann auf, wenn ein Ungleichgewicht zwischen Energieverbrauch und Energiezufuhr besteht.

Bei einem Schlaganfall z.B. fehlt die Blutzufuhr, die Nervenzellen sterben. Bei toxischen Übererregungen wie beim Status Epilepticus oder der amyotrophen Lateralsklerose verbrauchen die Zellen aufgrund der Übererregung vermehrt Energie und die Versorgung mit neuer Energie ist nicht mehr ausreichend (5). Zusätzlich wird von den Zellen der Neurotransmitter Glutamat ausgeschüttet. Die Neuronen können das Membranpotential aufgrund der erhöhten Konzentration an Glutamat und der ungenügenden Energieversorgung nicht mehr aufrechterhalten und depolarisieren. Durch die Aktivierung des KCNQ2/3 Kanals werden die Zellen hyperpolarisiert und können sich von den beschriebenen Noxen erholen.

Eine selektive Senkung der Erregbarkeit von solchen Nervenzellen kann daher den Nervenzelluntergang vorbeugen. Jedoch gab es bisher außer der Senkung der Körpertemperatur keine sichere direkte Methode zur Senkung der Erregbarkeit von Nervenzellen (5).

Durch die Aufdeckung der Bedeutung des Kanals KCNQ2/KCNQ3 für die selektive Steuerung der Erregbarkeit von Nervenzellen wurde deutlich, daß eine Aktivierung dieses Kanals Nervenzellschäden vorbeugen kann.

Aus den aufgezeigten Gründen ist eine selektive Beeinflussung des Kanals mit den Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 notwendig, um bei Aktivierung eine selektive z.B. antikonvulsive, anti-Parkinson und neuroprotektive Wirkung, und bei Hemmung eine selektive Gedächtnis verstärkende Wirkung zu erreichen.

Neben den erwähnten Erkrankungen sind alle Zustände beeinflussbar, die mit einer Übererregung oder mangelnden Erregung von Nervenzellen einhergehen, die den M-Kanal tragen oder in ihren Projektionsfeldern liegen.

Dieses Ziel kann mit den bisher vorhandenen Medikamenten und Behandlungsstrategien nicht erreicht werden.

Erfindungsgemäß konnte nun gezeigt werden, daß das Antikonvulsivum Retigabin (5, 6) hoch selektiv den aus den Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 bestehenden Kanal aktiviert, d.h. positiv moduliert.

Bisher war eine direkte positive Modulation dieses Kaliumkanals nicht möglich.

Es waren keine modulatorischen Bindungsstellen bekannt, an denen Substanzen angreifen können um den Kanal positiv oder negativ zu modulieren.

Substanzen wie Linopirdine und XE991 (3), waren nur in der Lage den Kanal zu blockieren.

Diese Substanzen sind zudem nicht ausreichend selektiv, da sie wahrscheinlich im Bereich der Kanalpore angreifen, ein Bereich, der bei allen Kaliumkanälen ähnlich und für die Selektivität des Kanals für Kaliumionen verantwortlich ist.

Substanzen, die den Spiegel des Botenstoffes cAMP beeinflussen oder Substanzen, die den Muskarinrezeptor beeinflussen, üben nur eine indirekte, nicht selektive Wirkung auf den Kanal aus.

Die antikonvulsive Wirkung von Retigabin läßt sich auf die Kaliumkanal-aktivierung zurückführen (7, 8).

Retigabin, ein 2-Amino-4-(4-fluorbenzylamino)-1-ethoxycarbonylaminobenzen und Verfahren zur Herstellung werden im EP 554 543 erstmals beschrieben.

Untersuchungen haben gezeigt, daß Retigabin keinen Effekt auf eine große Anzahl unterschiedlicher Kaliumkanäle aufweist (siehe Tabelle 1).

Dies sind im einzelnen:

Kir1.1 (ROMK1), Kir2.1 (IRK1), Kir2.2 (IRK2), Kir2.3 (IRK3), Kir3.1 (GIRK1), Kir3.2 (GIRK2), Kir3.3 (GIRK3), Kir3.4 (GIRK4), TWIK1, Heteromultimere aus GIRK1 und GIRK2, aus GIRK2 und GIRK4, aus GIRK2 und Girk3, r-eag1, r-erg1, r-erg3 und ATP-abhängige Kaliumkanäle (Kir6.2).

Damit konnte mit Retigabin eine Bindungsstelle charakterisiert werden, die für den Kanal, bestehend aus den Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3, hoch selektiv ist.

Retigabin aktivierte außerdem den homomeren Kanal, der ausschließlich aus der Untereinheit KCNQ2 besteht. In Zellen, die nur den homomeren Kanal aus der KCNQ3 Untereinheit exprimieren, sind nur marginale spannungsabhängige Ströme meßbar.

In diesen Zellen kann kein Strom durch die Applikation von Retigabin ausgelöst werden (siehe Tabelle 1). Während heteromultimere Kanäle bestehend aus KCNQ2 und KCNQ3 als molekulares Korrelat des M-Kanals in Nervenzellen nachgewiesen werden konnten, sind homomultimere Kanäle die ausschließlich aus KCNQ2 oder KCNQ3 Untereinheiten bestehen zwar in Zellkultursystemen artifiziell herstellbar, wurden aber in vivo bisher nicht nachgewiesen. Es kann davon ausgegangen werden, daß der heteromultimere Kanal bestehend aus KCNQ2 und KCNQ3 die physiologisch vorkommende Form dieses Kaliumkanals ist und daß Retigabin selektiv diesen Kanal aktiviert.

Dies ist der erstmalige Nachweis, daß eine selektive positive Modulation dieses Kanals möglich ist, d.h. daß der Kanal eine modulatorische Bindungsstelle besitzt, die außerhalb der Kanalpore liegt.

Bindungsstellen innerhalb der Kanalpore führen bei Bindung des Liganden zu einer Blockade des Kanals.

Wir konnten zeigen, daß die Bindungsstelle für Retigabin auf der Kanaluntereinheit KCNQ2 liegt.

Homomultimere Kanäle, die nur aus der Untereinheit KCNQ2 bestehen, werden von Retigabin aktiviert, jedoch können in Nervenzellen nur heteromultimere Kanäle mit dem KCNQ2 und KCNQ3 nachgewiesen werden.

Die Wirkung von Retigabin auf diese heteromultimeren Kanäle ist sehr stark und konzentrationsabhängig.

Wird der Kanal durch intrazelluläre Zugabe von sättigenden Konzentrationen des stabilen cAMP-Analogons 8Br cAMP (10 mM) maximal positiv beeinflusst, wie in (2) beschrieben, dann kann noch immer durch Retigabin eine deutliche Aktivierung ausgelöst werden.

Wir konnten dadurch zeigen, daß die selektive Wirkung von Retigabin unabhängig vom cAMP-Gehalt der Zelle ist.

Es lassen sich daher durch Retigabin Wirkungen auslösen, die über die von Schröder et al in (2) beschriebenen Wirkungen hinausgehen.

Tabelle 1: Wirkung von Retigabin auf verschiedene klonierte Kaliumkanäle

Kaliumkanaluntereinheit	Expressionssystem	Wirkung von Retigabin 10 μ M
Kir1.1 (ROMK1)	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
Kir2.1 (IRK1)	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
Kir2.2 (IRK2)	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
Kir2.3 (IRK3)	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
Kir3.1 (GIRK1)	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
Kir3.2 (GIRK2)	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
Kir3.3 (GIRK3)	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
Kir3.4 (GIRK4)	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
TWIK1	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
GIRK1 & GIRK2	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
GIRK2 & GIRK4	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
GIRK2 & Girk3	Krallenfrosch-Eizellen	Keine Wirkung
r-eag1	CHO-Zellen	Keine Wirkung
r-erg1	CHO-Zellen	Keine Wirkung
r-erg3	CHO-Zellen	Keine Wirkung
KCNQ2	CHO-Zellen	Schwache Aktivierung durch Aufgabe von 10 μ M Retigabin (165 ± 65 pA)
KCNQ3	CHO-Zellen	Keine Wirkung
KCNQ2 & KCNQ3	CHO-Zellen	Sehr starke Aktivierung durch Aufgabe von 10 μ M Retigabin (1527 ± 177 pA)
KCNQ2 & KCNQ3, in Gegenwart von stabilen cAMP-Analoga	CHO-Zellen	Starke Aktivierung durch Aufgabe von 10 μ M Retigabin (1100-1400 pA)

Methodenbeschreibung zur Tabelle 1:

Für die Versuche an Krallenfrosch-Eizellen wurden der Erfahrungswert für erfolgreiche Transfektionen 500 pg bis 37 ng der literaturbekannten als Klon vorliegenden mittels Polymerasekettenreaktion vermehrten Erbinformation (cRNA) für den zu untersuchenden Kanal durch Druckinjektion in die Eizellen appliziert. Die Oozyten wurden nach dieser Behandlung in Nährmedium gelegt und am Leben erhalten. Nach einer Woche wurden die Eizellen einzeln in eine Ableitkammer verbracht und unter Verwendung der 2-Elektroden-Spannungsklemme elektrophysiologisch untersucht. Dabei wurden die Eizellen ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV in 10 mV Schritten auf verschiedene Membranpotentiale zwischen -130 und +30 mV für jeweils 2 sec hyper- und depolarisiert und der resultierende Membranstrom gemessen. Diese Versuche wurden in Gegenwart von Kontrollösung sowie von 1, 10 und 100 μ M Retigabin durchgeführt und die erhaltenen Strom-Spannungskurven verglichen. In keiner der untersuchten Präparationen konnte durch Retigabin die Aktivität des transfizierten Kaliumkanals beeinflusst werden. Bei den in CHO-Zellen durchgeführten Versuchen wurde die Erbsubstanz für den zu untersuchenden Kanal auch mittels Liposomen in die Zelle eingebracht, die Ableitung mittels der Patch clamp Technik wurde 48-72 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Wieder wurden die Zellen auf -80 mV gehalten und in 10 mV Schritten von -100 bis +50 mV in Gegenwart von Kontrollösung oder Retigabin hyper- und depolarisiert. Zusätzlich wurde entsprechend einer bereits beschriebenen Methode (Rundfeldt, 1999b) auf Zellen, die leicht depolarisiert waren (-60 oder -50 mV) Retigabin in der Konzentration 10 μ M aufgegeben und der dadurch ausgelöste Strom quantifiziert. Die letztere Methode wurde angewandt, um die in der Tabelle dargestellten durch Retigabin ausgelösten Ströme zu quantifizieren. Bei Zellen, in denen durch Aufgabe von Retigabin einen Strom aktiviert werden konnte, d.h. in Zellen, die die Untereinheit KCNQ2 oder KCNQ2 zusammen mit KCNQ3 enthielten, war die durch schrittweise Hyper/Depolarisation gewonnene Strom-Spannungskurve in ihrer

Aktivierung zu negativeren Potentialen verschoben.

Daraus folgt eine frühere Öffnung des Kanals und damit verbunden eine Hyperpolarisation der Neuronen. Zur Überprüfung, ob die durch Retigabin ausgelöste Aktivierung des KCNQ2/3-Kanals (M-Kanals) noch möglich ist, wenn der Kanal wie von Schröder et al. 1988 beschrieben durch c-AMP maximal aktiviert ist, wurden in Versuchen eine sättigende Konzentration des nichthydrolysierbaren c-AMP-Analogons, 8-Brom-cAMP, in die Pipettenlösung gegeben. Auch unter diesen gesättigten Verhältnissen konnte Retigabin den Kanal stark aktivieren.

Durch Verwendung der erfindungsgemäßen modulatorischen Bindungsstelle können nun neue Substanzen gesucht werden, die den oben genannten Kanal entweder positiv (aktivieren) oder auch negativ modulieren.

Voraussetzung für die Auslösung einer Wirkung ist die Bindung eines möglichen Wirkstoffes an eine körpereigene Substanz, die man als Rezeptor bezeichnet.

Durch die Bindung muß in dieser Bindungsstelle eine Veränderung der Konformation hervorgerufen werden. Die Konformationsänderung führt zu einer Funktionsänderung des betroffenen Rezeptors. Dieser Vorgang vermittelt die eigentliche Wirkung des zu prüfenden Wirkstoffes an dem Rezeptor.

Basierend auf diesen Erkenntnissen können nun verschiedene Screeningsysteme aufgebaut werden, mit denen neue noch selektivere oder stärker wirkende Liganden zur Aktivierung oder Hemmung des M-Kanals gefunden werden können.

Die einfachste Implementierung eines Screeningsystems ist ein Bindungsassay.

Hierzu werden ein spezifischer über Isotope markierter ("heißer") Ligand für die zu untersuchende Bindungsstelle, derselbe Ligand in nicht markierter

("kalter") Form sowie zu untersuchende Testsubstanzen und eine Proteinpräparation, die den Rezeptor enthält benötigt.

Zur Durchführung von Bindungsassays sind Apparaturen und Arbeitsvorschriften kommerziell erhältlich bzw. wurden vielfach beschrieben. Zunächst wird die Proteinfraction zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen mit dem kalten spezifischen Liganden in hoher Konzentration vermischt. Nach Abfiltrieren und Spülen der Proteinfraction wird dann der heiße spezifische Ligand in definierter Menge und die zu testende Substanz in verschiedenen Konzentrationen auf die Proteinfraction gegeben. Nach einer definierten Einwirkungszeit zur Equilibrierung beider Substanzen an der Bindungsstelle wird der Überstand schnell abfiltriert und wiederum durch Spülen nicht am Rezeptor gebundene Anteile entfernt. Durch Messen der verbleibenden Radioaktivität oder einer anderweitigen Markierung des spezifischen Liganden in der Proteinfraction läßt sich feststellen, ob und wieviel des spezifischen Liganden durch die zu testende Substanz von der Bindungsstelle verdrängt wurde.

Wenn mit ansteigender Konzentration der Testsubstanz die Menge des spezifischen Liganden in der Proteinfraction abnimmt, dann ist davon auszugehen, daß die Testsubstanz den spezifischen Liganden konzentrationsabhängig von seiner Bindungsstelle kompetitiv verdrängt und somit selbst ein Ligand für diese Bindungsstelle ist.

Als heißer und kalter Ligand dient markiertes bzw. unmarkiertes Retigabin oder ein durch Retigabin charakterisierter Ligand mit noch besseren physikochemischen Eigenschaften.

Bindungsassays werden in ihrer Spezifität fast ausschließlich durch den verwendeten Liganden charakterisiert; ohne spezifischen Liganden sind Bindungsassays nicht durchführbar.

Die Proteinpräparation kann verschiedene Quellen haben, muß aber immer den zu untersuchenden Rezeptor, hier den M-Kanal oder die Bindungsstelle tragende Teile des M-Kanals wie die Untereinheit KCNQ2 oder Teile davon enthalten.

Entscheidend ist, daß eine kompetitive Bindung des spezifischen Liganden an dem Protein möglich ist.

Das Protein kann

- aus nativem neuronalem Gewebe von Menschen (post mortem oder aus operativ entferntem Gewebe) oder von Tieren
- aus M-Kanal enthaltenden Zellkulturen wie der differenzierten Zelllinie PC12 oder NG108-15 oder aus humanen Zelllinien wie der Linie hNT
- aus Zellkulturen, die durch transiente oder stabile Transfektion (= Einbringung von genetischer Information in die Zelle mittels literaturbekannter Methoden) mit der genetischen Information zur Herstellung der Kanaluntereinheit KCNQ2 alleine oder in Kombination mit der Untereinheit KCNQ3 oder Teilen der Untereinheit KCNQ2 versehen wurden und die diese Information in funktionelles Protein übersetzen
- aus anderen Protein produzierenden Systemen wie Hefezellkulturen, Bakterienkulturen, Pflanzen oder Virenkulturen, sofern in die Hefen, Bakterien, Pflanzen oder Viren die genetische Information zur Herstellung des Rezeptors eingepflanzt wurde gewonnen werden.

Bindungsassays haben den Vorteil, daß durch Einsatz des spezifischen Liganden nur Substanzen gefunden werden, die an dieselbe Bindungsstelle binden wie der spezifische Ligand. Die Anforderungen an die Reinheit der Proteinfraction sind daher nicht hoch und es kann mit nativem Material wie Hirngewebe gearbeitet werden.

Bindungsassays sind jedoch zugleich in ihrer Aussage begrenzt.

So kann nur festgestellt werden, ob eine zu untersuchende Substanz an die fragliche Bindungsstelle (= Rezeptor) bindet oder nicht.

Es wird dagegen nicht untersucht, ob die Substanz durch die Bindung am Rezeptor auch eine Wirkung auslöst.

Theoretisch sind immer Substanzen denkbar, die binden und keine Wirkung auslösen (= neutrale Liganden), Substanzen die über den Rezeptor das Substrat (hier den M-Kanal) aktivieren (=Agonisten) oder Substanzen, die über den Rezeptor das Substrat hemmen (=Antagonisten).

Wie oben erwähnt sind M-Kanalagonisten unter anderem für die Epilepsie von Interesse, wohingegen M-Kanalantagonisten für z.B. den Morbus Alzheimer von Bedeutung sind.

Es ist daher notwendig, funktionelle Tests zur Charakterisierung der Wirkung der Testsubstanz zu verwenden.

Die sicherste Methode zur Charakterisierung von Rezeptorliganden besteht in der elektrophysiologischen Untersuchungen an Zelllinien oder Zellkulturen wie für Retigabin beschrieben (8). Diese Untersuchungen sind sehr aufwendig, da jede einzelne Zelle unter Sichtkontrolle mittels Glaselektroden abgeleitet werden muß.

Testsubstanz und Referenz (Retigabin) werden durch spezielle Applikationssysteme auf die Zellen aufgegeben und die Beeinflussung der Zellfunktion in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration der Testsubstanz bewertet.

In der letzten Zeit wurden jedoch vermehrt funktionelle Screeningtests mit hohem Durchsatz an Substanzen (bis mehrere Tausend Substanzen pro Stunde, High Throughput Screening, HTS) beschrieben.

Da hier im Gegensatz zum Bindungsassay die Zellfunktion im Vergleich zur Wirkung des spezifischen Liganden (hier Retigabin oder ein durch Retigabin charakterisierter Ligand mit noch besseren physikochemischen Eigenschaften) bewertet wird, ist es notwendig, daß die zu untersuchende Bindungsstelle in genetisch definierter Form und zugleich als funktionelle Einheit in dem System vorliegt. Bei dem System kann es sich um Zellkulturen oder um künstlich hergestellte zellähnliche Konstrukte (Lipiddoppelmembranen) mit funktionell eingelagertem Rezeptor/Kanal handeln. Die Zellkulturen müssen den zu untersuchenden Rezeptor (hier den M-Kanal)

sicher und reproduzierbar exprimieren und funktionell in die Membran einbauen.

Weiterhin muß ein Reportersystem in die Zellen bzw. zellähnlichen Konstrukte eingebracht werden, welches eine Aktivierung oder eine Inaktivierung des Kanals sicher und maschinell ablesbar anzeigt.

Die Zellkultur darf neben dem (natürlich vorkommenden oder durch Transfektion eingebrachten) Rezeptor keine oder nur möglichst wenige weitere Kanäle/Rezeptoren mit ähnlicher Funktion oder mit enger Verwandtschaft zu dem zu untersuchenden Kanal/Rezeptor enthalten, um falsch positive Ergebnisse weitgehend auszuschließen.

Als Zellkulturen sind nicht neuronale Zelllinien wie die weit verbreitete CHO-Zelle oder HEK-Zelle, aber auch eine Vielzahl von anderen Zelllinien wie z.B. Insektenzelllinien oder humane Zelllinien verwendbar, wenn diese durch Transfektion mit dem Genom für den M-Kanal (KCNQ2/3) oder auch ausschließlich mit der Untereinheit KCNQ2 versehen wurden und diese funktionell exprimieren.

Native Zelllinien, die den M-Kanal tragen, wie z.B. die Zelllinie PC12 (nach Differenzierung mit dem Wachstumsfaktor NGF) oder die Zelllinie NG108-15 (nach Differenzierung zum neuronalen Phänotyp) sind auch verwendbar, tragen aber das Risiko, daß neben dem M-Kanal noch weitere Kaliumkanäle mit ähnlicher Charakteristik exprimiert werden.

Als Reportersysteme sind beispielsweise extern zugegebene kalziumsensitive Fluoreszenzfarbstoffe geeignet. Damit diese Farbstoffe als indirekte Methode zum Nachweis einer Depolarisation angewandt werden können, müssen die Zellsysteme neben den zu untersuchenden Kaliumkanälen auch spannungsabhängig aktivierbare Kalziumkanäle enthalten. Da durch Depolarisation von Zellen (z.B. durch Blockade des M-Kanals) Kalziumkanäle aktiviert werden und dadurch Kalzium in die Zellen einströmt, können bekannte Farbstoffe verwendet werden, die die intrazelluläre Kalziumkonzentration widerspiegeln. Auch können in die zu

verwendenden Zelllinien durch Transfektion Chemolumineszenzgene eingebracht werden. Die resultierenden Proteine reagieren auf den Einstrom von Kalzium mit Chemolumineszenz. M-Kanal Agonisten lassen sich dadurch detektieren, daß die Membran hyperpolarisiert oder daß eine extern induzierte Depolarisation verhindert wird. Kalziumabhängige Farbstoffe zeigen an, daß aufgrund der fehlenden Depolarisation im Vergleich zur Kontrolle der KalziumEinstrom ausbleibt.

M-Kanal-Antagonisten lösen selbst eine meßbare Depolarisation aus und führen zum KalziumEinstrom. Dadurch können in einem solchen System sowohl Agonisten als auch Antagonisten des M-Kanals gefunden werden. Zur Quantifizierung der Wirkung ist es notwendig, daß ein bekannter Standard als Positivkontrolle eingesetzt wird.

Retigabin ist der erste bekannte selektive M-Kanalagonist.

In der vorliegenden Patentanmeldung wird auf folgende Literatur Bezug genommen:

- (1) Sewing, S., Röper, J., and Pongs, O.: Structure and function of voltage-gated K^+ channels. *Neuroforum* 2, 21-28, 1996.
- (2) Schroeder, B.C., Kubisch, C., Stein, V., Jentsch, T.J. Moderate loss of function of cyclic-AMP modulated KCNQ2/KCNQ3 K^+ channels causes epilepsy. *Nature* 396, 687-690, 1998.
- (3) Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohen, U.S., Dixon, J.E., McKinnon, D. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282, 1890-1893, 1998.
- (4) Janz, D. (1985) Epilepsy: Seizures and syndromes. In: Frey, H.-H. and Janz, D. eds, Antiepileptic drugs. Handbook of experimental pharmacology, Vol. 74, pp 3-34, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork, Tokyo.

- (5) Rundfeldt, C., Potassium channels and neurodegenerative diseases. Drug News and Perspectives 12, 99-104, 1999.

- (6) Rostock, A., Tober, C., Rundfeldt, C., Bartsch, R., Engel, J., Polymeropoulos, E.E., Kutscher, B., Löscher, W., Hönack, D., White, H.S., and Wolf, H.H.. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. Epilepsy. Res. 23, 211-223, 1996

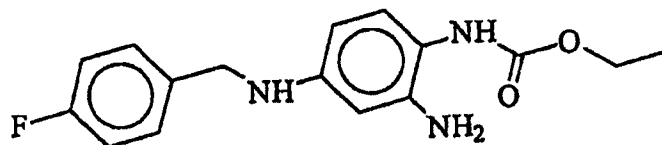
- (7) Rundfeldt, C. The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K⁺ channels in neuronal cells, Eur. J. Pharmacol., 336 (1997) 243-249

- (8) Rundfeldt, C. Characterization of the K⁺ channel opening effect of the anticonvulsant retigabine in PC12 cells. Epilepsy Res. 35, 99-107, 1999b

- (9) Porter, R.J. Classification of epileptic seizures and epileptic syndromes. In: Laidlaw J., Richens A., Chadwick D., (eds): A Textbook of Epilepsy. Churchill Livingstone, New York, 1993, pp. 1-22.

Patentansprüche

1. Selektive modulatorische Bindungsstelle des Kaliumkanals mit den Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 dadurch gekennzeichnet, daß diese durch Retigabin der Formel



charakterisiert ist.

2. Verwendung von Zellpräparationen die natürlicherweise oder durch Transfektion die genetische Information für den Kaliumkanal mit den Untereinheiten KCNQ2 alleine oder in Verbindung mit der Untereinheit KCNQ3 enthalten und diese genetische Information in Protein übersetzen zur Auffindung von Substanzen, die diesen Kanal über die durch Retigabin charakterisierbare Bindungsstelle gemäß Anspruch 1 wie Retigabin auch positiv modulieren, d. h. aktivieren.
3. Verwendung von Zellpräparationen die natürlicherweise oder durch Transfektion die genetische Information für den Kaliumkanal mit den Untereinheiten KCNQ2 alleine oder in Verbindung mit der Untereinheit KCNQ3 enthalten zur Auffindung von Substanzen, die diesen Kanal über die durch Retigabin charakterisierbare Bindungsstelle gemäß Anspruch 1 negativ modulieren, d. h. in seiner Funktion reduzieren.

4. Verwendung von Zellpräparationen die natürlicherweise oder durch Transfektion die genetische Information für den Kaliumkanal mit den Untereinheiten KCNQ2 alleine oder in Verbindung mit der Untereinheit KCNQ3 enthalten zur Auffindung von Substanzen mittels Bindungsassays, die an die durch Retigabin charakterisierbare Bindungsstelle gemäß Anspruch 1 an diesem Kanal binden.
5. Verwendung von Zellpräparationen nach einem der Ansprüche 2 bis 4 zur Herstellung von Fraktionen der Zellpräparation, die nicht mehr die genetische Information, wohl aber das der genetischen Information entsprechende Protein enthalten zur Auffindung von Substanzen, die eine oder mehrere der unter den Ansprüchen 1 bis 3 angeführten Eigenschaften aufweisen.
6. Verwendung von Zellen oder Zellpräparationen nach einem der Ansprüche 2 bis 5 in automatisierbaren Screeningsystemen zum Hoch-Durchsatz-Screening unter Verwendung von kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen oder Chemolumineszenzgenen als Reportersystem zur Auffindung von Substanzen, die eine oder mehrere der unter den Ansprüchen 1 bis 3 angeführten Eigenschaften aufweisen.
7. Verwendung von Präparationen nach einem der Ansprüche 2 bis 5, die nicht die vollständige genetische Information des Kanals bestehend aus KCNQ2 und KCNQ3, wohl aber den Bestandteil der genetischen Information, der die Bindungsstelle für Retigabin kodiert hat, enthalten oder die nur den Teil des Proteins, der die Bindungsstelle für Retigabin enthält, enthalten, zum Aufbau von Systemen nach einem der Ansprüche 2 bis 6 zur Auffindung von neuen Substanzen.

8. Verwendung von Zellpräparationen nach einem der Ansprüche 2 bis 5 ,
die einen Anteil der genetischen Information der Kanäle KCNQ2 oder 3
zusammen mit der genetischen Information für Anteile anderer Kanäle
oder Proteine als chimäre genetische Information enthalten, und deren
Übersetzung ein chimäres Protein ergibt, das die Bindungsstelle für
Retigabin enthält, zum Aufbau von Systemen nach einem der Ansprüche
2 bis 6 zur Auffindung von neuen Substanzen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/07348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	RUNDFELDT CHRIS ET AL: "The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits." NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 282, no. 1-2, 17 March 2000 (2000-03-17), pages 73-76, XP000972246 ISSN: 0304-3940 the whole document	1-8
X	WO 99 21875 A (UNIV UTAH RES FOUND) 6 May 1999 (1999-05-06) page 38, line 4 -page 42, line 12	1
A	page 45, line 24 -page 46, line 20 -/--	2-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2000

Date of mailing of the international search report

21/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/EP 00/07348

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 07832 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 18 February 1999 (1999-02-18) claims 1-4,20	1 2-8
A		
X	SCHROEDER BJORN C ET AL: "Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3K+ channels causes epilepsy." NATURE (LONDON), vol. 396, no. 6712, 17 December 1998 (1998-12-17), pages 687-690, XP002154361 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document	1 2-8
A		
X	WANG HONG-SHENG ET AL: "KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: Molecular correlates of the M-channel." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 282, no. 5395, 4 December 1998 (1998-12-04), pages 1890-1893, XP002900985 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	1
A		
A	WO 99 31232 A (ZENECA LTD) 24 June 1999 (1999-06-24) page 41, line 4 -page 43, line 25 page 75, line 6 -page 88, line 8; examples 9-13	1-8
A		
A	US 5 328 830 A (JANIS RONALD A ET AL) 12 July 1994 (1994-07-12) claim 1	1-8
A		
A	RUNDFELDT CHRIS: "Characterization of the K+ channel opening effect of the anticonvulsant retigabine in PC12 cells." EPILEPSY RESEARCH, vol. 35, no. 2, June 1999 (1999-06), pages 99-107, XP000972218 ISSN: 0920-1211 cited in the application the whole document	1-8
T		
	WICKENDEN ALAN D ET AL: "Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels." MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 58, no. 3, September 2000 (2000-09), pages 591-600, XP000972243 ISSN: 0026-895X the whole document	1-8
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 00/07348

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>MAIN MARTIN J ET AL: "Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine." MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 58, no. 2, August 2000 (2000-08), pages 253-262, XP000972245 ISSN: 0026-895X the whole document</p>	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. nat. Application No

PCT/EP 00/07348

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9921875	A	06-05-1999	EP 1037900 A	27-09-2000
WO 9907832	A	18-02-1999	AU 8266598 A EP 1007638 A	01-03-1999 14-06-2000
WO 9931232	A	24-06-1999	AU 1569599 A EP 1036175 A	05-07-1999 20-09-2000
US 5328830	A	12-07-1994	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07348

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C07K A01K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	RUNDFELDT CHRIS ET AL: "The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits." NEUROSCIENCE LETTERS, Bd. 282, Nr. 1-2, 17. März 2000 (2000-03-17), Seiten 73-76, XP000972246 ISSN: 0304-3940 das ganze Dokument	1-8
X	WO 99 21875 A (UNIV UTAH RES FOUND) 6. Mai 1999 (1999-05-06) Seite 38, Zeile 4 -Seite 42, Zeile 12	1
A	Seite 45, Zeile 24 -Seite 46, Zeile 20 -/-	2-8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

*A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

*E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

*L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

*O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

*P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

*T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

*X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

*Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

*Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/12/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31.651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hart-Davis, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07348

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C07K A01K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwandete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	RUNDFELDT CHRIS ET AL: "The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits." NEUROSCIENCE LETTERS, Bd. 282, Nr. 1-2, 17. März 2000 (2000-03-17), Seiten 73-76, XP000972246 ISSN: 0304-3940 das ganze Dokument	1-8
X	WO 99 21875 A (UNIV UTAH RES FOUND) 6. Mai 1999 (1999-05-06) Seite 38, Zeile 4 -Seite 42, Zeile 12	1
A	Seite 45, Zeile 24 -Seite 46, Zeile 20 -/-	2-8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

A Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Dezember 2000

Abenddatum des internationalen Recherchenberichts

21/12/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentleaz 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31.651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Hart-Davis, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 07832 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 18. Februar 1999 (1999-02-18)	1
A	Ansprüche 1-4,20	2-8
X	SCHROEDER BJORN C ET AL: "Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3K+ channels causes epilepsy." NATURE (LONDON), Bd. 396, Nr. 6712, 17. Dezember 1998 (1998-12-17), Seiten 687-690, XP002154361 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt	1
A	das ganze Dokument	2-8
X	WANG HONG-SHENG ET AL: "KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: Molecular correlates of the M-channel." SCIENCE (WASHINGTON D C), Bd. 282, Nr. 5395, 4. Dezember 1998 (1998-12-04), Seiten 1890-1893, XP002900985 ISSN: 0036-8075 in der Anmeldung erwähnt	1
A	das ganze Dokument	
A	WO 99 31232 A (ZENECA LTD) 24. Juni 1999 (1999-06-24) Seite 41, Zeile 4 -Seite 43, Zeile 25 Seite 75, Zeile 6 -Seite 88, Zeile 8; Beispiele 9-13	1-8
A	US 5 328 830 A (JANIS RONALD A ET AL) 12. Juli 1994 (1994-07-12) Anspruch 1	1-8
A	RUNDFELDT CHRIS: "Characterization of the K+ channel opening effect of the anticonvulsant retigabine in PC12 cells." EPILEPSY RESEARCH, Bd. 35, Nr. 2, Juni 1999 (1999-06), Seiten 99-107, XP000972218 ISSN: 0920-1211 in der Anmeldung erwähnt	1-8
T	das ganze Dokument	
	WICKENDEN ALAN D ET AL: "Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels." MOLECULAR PHARMACOLOGY, Bd. 58, Nr. 3, September 2000 (2000-09), Seiten 591-600, XP000972243 ISSN: 0026-895X das ganze Dokument	1-8

	---/---	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07348

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
T	<p>MAIN MARTIN J ET AL: "Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine." MOLECULAR PHARMACOLOGY, Bd. 58, Nr. 2, August 2000 (2000-08), Seiten 253-262, XP000972245 ISSN: 0026-895X das ganze Dokument</p>	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07348

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9921875	A	06-05-1999	EP	1037900 A	27-09-2000
WO 9907832	A	18-02-1999	AU	8266598 A	01-03-1999
			EP	1007638 A	14-06-2000
WO 9931232	A	24-06-1999	AU	1569599 A	05-07-1999
			EP	1036175 A	20-09-2000
US 5328830	A	12-07-1994	KEINE		